

PHARMACOLOGIE. — *Liaisons de haute affinité de la 5 hydroxytryptamine (5 HT) sur diverses préparations membranaires de cerveau de Bovin. Relations avec le diéthylamide de l'acide lysergique (LSD).* Note (*) de **Gilles Fillion, Marie-Paule Fillion, Jean-Claude Rousselle, Dominique Beaudoin, Michel Goiny et Joseph Jacob**, présentée par M. Auguste Loubatières †.

La 5 hydroxytryptamine se fixe au niveau des fractions brutes de cerveau de Bovin sur deux types de sites de liaison de haute affinité ($K_D = 1 \text{ à } 2 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ et $K_D = 1 \text{ à } 2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$). Il en est de même pour le LSD ($K_D = 3 \text{ à } 4 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ et $K_D = 2 \text{ à } 3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$).

L'étude de la distribution de ces sites sur des fractions sub-cellulaires indique que les sites correspondants aux deux types d'affinité sont présents dans des fractions de membranes microsomales mais que dans les fractions de membranes synaptosomales purifiées sont observés seulement les sites de haute affinité. Ces derniers apparaissent différents pour la 5 HT et pour le LSD; par contre, une relation directe pourrait exister au niveau des membranes microsomales entre la liaison de faible affinité de la 5 HT et la fixation du LSD.

5 hydroxytryptamine binds to crude brain membrane preparations with two different affinities ($K_D = 1 \text{ to } 2 \times 10^{-9} \text{ M}$ for the highest, $1 \text{ to } 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ for the lowest). LSD also binds with two affinities ($K_D = 3 \text{ to } 4 \times 10^{-9} \text{ M}$ and $K_D = 2 \text{ to } 3 \times 10^{-8} \text{ M}$).

Subcellular distribution of these sites shows that binding involves the two binding affinities in microsomal membranes but solely the high affinity binding sites are present in purified synaptosomal membranes. High affinity sites for 5 HT and for LSD are different as no direct competitive inhibition is observed in that case. On microsomal membranes, direct relationship occurs between low affinity binding for 5 HT and high affinity binding for LSD.

Les résultats de nombreuses études pharmacologiques tendent à établir l'existence de sites communs d'action pour la 5 hydroxytryptamine (5 HT) et le diéthylamide de l'acide lysergique (LSD). Nous avons dans ce travail étudié les liaisons de sérotonine sur divers extraits de cerveau de Bovin, recherché la distribution subcellulaire des sites correspondants et étudié au niveau des sites observés les interrelations existant entre 5 HT et LSD.

Des cerveaux de Bovin prélevés 20 à 30 mn après la mort de l'animal ont été disséqués, et diverses régions prélevées (en général le striatum), et homogénéisées dans du saccharose 0,32 M à 0°C à l'aide d'un appareil de Potter. L'homogénat a été centrifugé à 1 000 g pendant 5 mn, le surnageant ainsi obtenu centrifugé ensuite à 17 000 g pendant 20 mn pour obtenir une fraction mitochondriale brute. Deux types de techniques ont été alors utilisées selon les cas : (a) celle décrite par Whittaker et coll. (1964) qui permet après lyse de la fraction mitochondriale brute et son fractionnement sur gradient discontinu de saccharose, l'obtention de fractions diverses caractérisées par leur enrichissement relatif en vésicules, en membranes microsomales, en membranes synaptosomales ou en mitochondries; (b) celle décrite par Cotman et Matthews (1971) qui permet de préparer une fraction de membranes synaptosomales purifiées à partir de synaptosomes séparés sur gradient discontinu de Ficoll, fraction qui est ensuite lysée puis subfractionnée sur un gradient discontinu de sucrose.

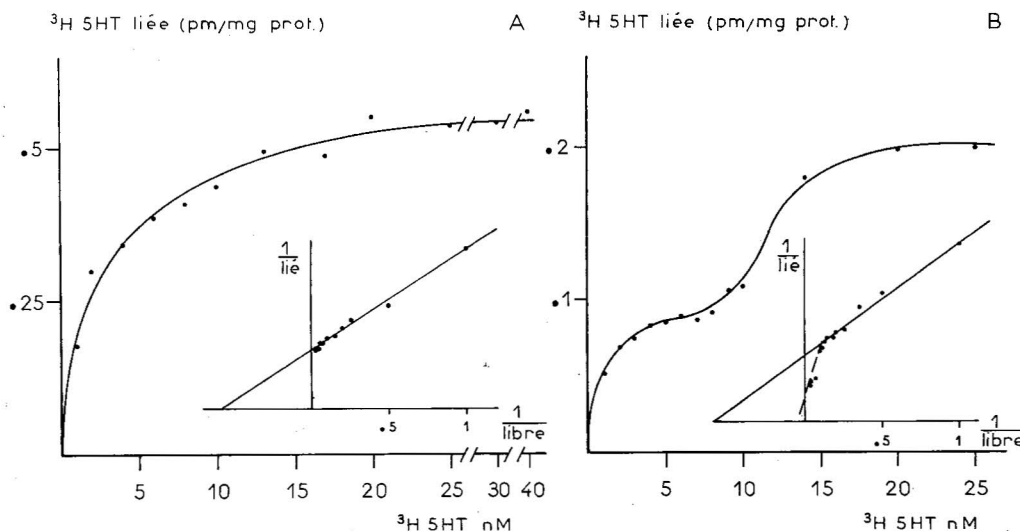
Les essais de liaison ont été réalisés en incubant les échantillons dans un milieu tamponné à pH 7,4 en présence de concentrations variées de 5 HT tritiée. La séparation de la radioactivité fixée de la radioactivité libre a été réalisée par ultrafiltration sous vide. La fixation réversible a été déterminée en retranchant des valeurs ainsi obtenues celle de la radioactivité restée sur le filtre après addition préalable d'une concentration élevée de 5 HT non radioactive au milieu d'incubation. La radioactivité restée sur le filtre était mesurée par scintillation liquide. La mesure des quantités de protéines était réalisée par la méthode de Lowry et coll. (1951).

RÉSULTATS. — Sur des extraits bruts de cerveau de Bovin (surnageant 1 000 g d'homogénat ou fraction mitochondriale brute) la 5 HT se fixe selon une progression dont l'analyse par représentation graphique de Scatchard ou de Lineweaver-Burk indique l'existence de deux types de sites de liaison; l'un correspond à une affinité relativement faible caractérisée

par un coefficient de dissociation $K_D = 1$ à $2 \cdot 10^{-8}$ M, le second que nous avons précédemment décrit chez le Rat (Fillion et coll., 1976) correspond à une affinité élevée ($K_D = 1$ à $2 \cdot 10^{-9}$ M). La fixation observée dans ces préparations brutes met en jeu une majorité de sites de liaison de faible affinité.

L'étude des courbes de fixation de la 5 HT sur diverses subfractions de ces extraits de cerveau indique :

(a) que les sites de fixation observés sont membranaires. En effet, le pourcentage de liaison réversible par la 5 HT par rapport à la liaison totale augmente parallèlement à l'enrichissement des diverses subfractions en structures membranaires. Ce rapport est de 20 % dans l'homogénat brut, de 30 % dans la fraction mitochondriale brute lysée et atteint 40 %



Liaison spécifique réversible de la 5 HT tritiée sur :

A. Préparation de membranes synaptosomales purifiées;

B. Fraction mitochondriale brute lysée de cerveau de Bovin.

Chacune des courbes de fixation est également représentée dans le système des doubles inverses (Lineweaver-Burk).

dans la fraction microsomale. Il diminue par contre dans les fractions non membranaires, notamment celles enrichies en vésicules (moins de 15 %) ou en mitochondries (10 %) ce qui montre qu'il s'agit ni de sites de mise en réserve, ni d'enzymes du type monoamine oxydase. L'intégrité de la molécule de ligand après sa fixation a été démontrée par chromatographie.

(b) que la proportion de sites de fixation correspondant à des sites de liaison de haute affinité croît avec l'enrichissement des fractions en membranes synaptosomales. Elle atteint une valeur proche des 100 % dans la fraction de membranes synaptosomales purifiées; la capacité de liaison correspondante est alors de 0,4 à 0,5 pmole de 5 HT par milligramme de protéine.

Ces résultats indiquent que la fixation de haute affinité de la 5 HT ($K_D = 1$ à $2 \cdot 10^{-9}$ M) pourrait intéresser exclusivement des sites localisés sur les membranes des terminaisons neuronales sérotonergiques alors que les sites correspondant à l'affinité plus faible ($K_D = 1$ à $2 \cdot 10^{-8}$ M) seraient localisés sur des membranes microsomales. D'autres interprétations

ne sont pas à exclure (par exemple celle faisant intervenir des états conformationnels différents du même site localisé sur des préparations différentes).

La fixation de LSD étudiée sur ces mêmes types de préparation met en jeu deux types de sites sur des fractions brutes de cerveau ($K_D = 3$ à $4 \cdot 10^{-9}$ M et $K_D = 2$ à $3 \cdot 10^{-8}$ M). Sur des fractions enrichies en membranes synaptosomales ou des fractions de membranes synaptosomales purifiées la fixation de LSD s'effectue sur un type de site de liaison de haute affinité ($K_D = 3$ à $4 \cdot 10^{-9}$ M).

Les interactions entre LSD et 5 HT ont été étudiées sur des fractions de membranes purifiées. Les sites de liaison de haute affinité pour le LSD et les sites de liaison de haute affinité pour la 5 HT ne semblent pas être identiques; aucune inhibition de type compétitif entre 5 HT et LSD n'a en effet été observée sur ces préparations. Par contre, sur des préparations brutes, des inhibitions de type compétitif ont été observées, elles intéressaient les liaisons de faible affinité (microsomales) de la 5 HT.

En conclusion, il semble bien que deux types de sites de liaison membranaire existent pour la 5 HT, qu'ils sont bien distincts puisque localisés sur deux types de fractions et que la liaison de haute affinité de la 5 HT sur les sites synaptosomaux ne semble pas en relation directe avec celle du LSD. Une telle relation directe peut cependant exister au niveau des sites sérotonergiques microsomaux. L'hypothèse de l'existence d'un seul site sérotonergique sous deux conformations différentes ne doit cependant pas être totalement écartée dans la mesure où le type de préparation membranaire pourrait favoriser l'une ou l'autre des conformations.

(*) Séance du 10 janvier 1977.

(¹) V. P. WHITTAKER, I. A. MICHAELSON et R. J. A. KIRKLAND, *Biochem. J.*, 90, 1964, p. 293-305.

(²) C. W. COTMAN et D. A. MATTHEWS, *Biochem. Biophys. Acta.*, 249, 1971, p. 380-394.

(³) O. H. LOWRY, H. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, p. 265-275.

(⁴) G. FILLION, M. P. FILLION, C. SPIRAKIS, J. M. BAHERS et J. JACOB, *Life Sciences*, 18, 1976, p. 65-74.

Institut Pasteur,
Service de Pharmacologie et Toxicologie,
28, rue du Docteur-Roux,
75724 Paris Cedex 15.